

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



51

Int. Cl.:

A 61 k, 17/00

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES

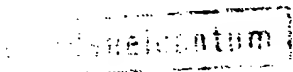


PATENTAMT

52

Deutsche Kl.:

30 h, 2/04



10

11

# Offenlegungsschrift 1792 196

21

Aktenzeichen: P 17 92 196.9

22

Anmeldetag: 1. August 1968

43

Offenlegungstag: 18. Mai 1972

Ausstellungspriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: 2. August 1967

33

Land: V. St. v. Amerika

31

Aktenzeichen: 657971

54

Bezeichnung: Verfahren zur Stabilisierung eines Proteins

61

Zusatz zu: 1 617 332

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: Diagnostic Data Inc., San Francisco, Calif. (V. St. A.)

Vertreter gem. § 16 PatG: Siebert, K., Dipl.-Ing., Patentanwalt, 8130 Starnberg

72

Als Erfinder benannt: Huber, Wolfgang, San Francisco, Calif. (V. St. A.)

Benachrichtigung gemäß Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 d. Ges. v. 4. 9. 1967 (BGBl. I S. 960): 13. 3. 1970  
Prüfungsantrag gemäß § 28 b PatG ist gestellt

DT 1 792 196

1792196

14 280

Diagnostic Data, Inc.  
in San Francisco (USA)

**Verfahren zur Stabilisierung eines Proteins**

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Stabilisierung eines gemäß Stammpatent Nr. .... (Patentanmeldung B 89.232 IV a/30h) erhältlichen Protein-Metall-Chelates, dessen Protein ein Protein vom Globulintyp ist, in seiner Struktur  $\alpha$ -helical ist und keine antigenetische Wirkung zeigt. Die Stabilisierung kann mit Sucrose oder einem anderen Saccharid vorgenommen werden.

- 1 -

209821/0960

Das im Stamm Patent Nr. .... definierte Protein bzw. das in einem Protein-Metall-Chelat enthaltene Protein ist ein schraubenförmig aufgebautes Protein u.zw. scheinen zumindest 80 % desselben schraubenförmige Konfiguration zu besitzen. Bei Bestimmung der optischen Drehung zeigt das Protein einen deutlichen Cotton-Effekt, was darauf hindeutet, daß vorwiegend eine  $\alpha$ -Schraube vorliegt (siehe Blout, "Polypeptides and Proteins", Kapitel 17, Djerassi Editor, McGraw-Hill Publishers 1960). Diese schraubenförmige Struktur, welche Voraussetzung ist für die pharmakologischen Eigenschaften des erfindungsgemäß erhältlichen Proteins scheint auf den niedrigen Anteil, u.zw. weniger als 15 % und wahrscheinlich 13 % "kettenabbrechenden" Aminosäureresten, wie Serin, Threonin, Prolin, Isoleucin und Cystein, der insgesamt vorliegenden Aminosäurereste zurückzuführen zu sein.

Die durchschnittliche Elementaranalyse des Proteinchelats lautet: 50,02 % C, 7,92 % H, 25,55 % O, 15,26 % N, 0,43 % S, 0,00 % P, <1 % Asche. Der Stickstoffgehalt gemäß dieser Elementaranalyse liegt etwas niedriger als der typischer Proteine, was darauf hindeutet, daß im erfindungsgemäß isolierbaren Protein auch Nicht-Proteine enthalten sind. Diese Tatsache wird durch unter Verwendung eines Jod-Schiff Indikators (Iodo-Schiff stain) durchgeführter Gelscheiben-Elektrophorese bestätigt. Nach saurer Hydrolyse des Proteins durchgeführte Prüfungen mit Zuckerreagentien weisen auf die Anwesenheit von etwa 4 bis 5 % Kohlenhydrat, darunter als Glukose, hin, welches wahrscheinlich kovalent an das Protein gebunden ist.

Bei der Gaschromatographie und der Elektrophorese zeigt sich, daß das erfindungsgemäß isolierte Protein kein Lipid-Protein ist, d.h. daß es weniger als 0,01 % Lipid-Phosphor, weniger als 0,1 % Cholesterolin und weniger als 0,05 % Galaktolipid enthält und daß wasserlösliche Glyko-Lipoide nicht nachweisbar sind.

Das Molekulargewicht des erfindungsgemäß isolierbaren Proteinchelats beträgt etwa 34000 (32600)  $\pm 10\%$  bis 28500  $\pm 10\%$ . Auf diesem Molekulargewicht bezogen und unter Berücksichtigung des Aschegehaltes von 0,3 % enthält dieses Proteinchelat insgesamt 205 bis 243 Aminosäurereste und etwa 2 bis 4 g-Atom Metalle pro Mol. Dieses Molekulargewicht ergibt sich auf osmotischem Wege, aus dem Aminosäurenprofil und durch Gelfiltration auf einer mit Sephadex G-200 (Pharmacia, Inc.) gefüllten Kolonne mit 90 cm Höhe und 2,5 cm Durchmesser und Eluieren mit physiologischer Kochsalzlösung und einem Phosphatpuffer (pH 7,4), wobei unter Verwendung von Ribonuclease, Chymotrypsin, Albumin und  $\gamma$ -Globulin als Vergleichsstandard gearbeitet wird. In diesem Molekulargewicht sind die 4 bis 5 % Kohlehydrat mitberücksichtigt.

Die Analyse der Aminosäuren ergibt, daß das erfindungsgemäß isolierbare Protein von allen wesentlichen Aminosäuren aufgebaut ist. Es ist im wesentlichen frei von Cystein und anderen schwefelhaltigen Gruppen, d.h. daß es nur 0,5 bis 1, meist 0,5 Cysteinreste und 3 bis 4, meist 3 Methioninreste pro Mol und keine weiteren schwefelhaltigen Gruppen enthält. Das erfindungsgemäß isolierbare Protein ist beispielsweise hinsichtlich des Aminosäurenprofils deutlich verschieden von Katalase, Arginase und

209821-3-0960

and ren aktiven Proteinen. Es besitzt inen außergewöhnli h niedrigen Gehalt an Serin und Threonin und zwar liegen hi von pro Mol etwa 2 bzw. 5, in der Regel 2 bis 4, Reste vor.

Dieses Protein enthält reichlich basische Aminosäuren und zwar 9 bis 11 Arginin-, 15 bis 18 Histidin- und 22 bis 26 Lysinreste.

Das erfindungsgemäß isolierbare Metallohelat eines Proteins zeichnet sich somit durch ein ungewöhnlich niedriges Verhältnis von Resten saurer Aminosäuren zu Resten basischer Aminosäuren aus und dieses Verhältnis beträgt 0,565. Bei Proteinen (CO<sub>2</sub>-Anhydrase-B, Laoto-Globulin und Rinderleber-Albumin), welche im Rahmen des Ungar-Testes keine nennenswerte antiinflammatorisch Wirkung zeigen ist dieses Verhältnis größer als 0,75.

In den Tabellen Ia und Ib ist nun das Aminosäurenprofil d s erfindungsgemäß isolierbaren neuen Metallohelats den Aminosäurenprofilen anderer, aus ähnlichen Quellen isolierten biologisch aktiven Proteinen verglichen<sup>2</sup> gegenübergestellt. Der theoretische Aminosäuregehalt der Probe (86,1 %), unter Zugrundelegung eines aus dem Aminosäurenprofil und dem elementaranalytisch bestimmten Stickstoffgehalt berechneten Faktors (5,64), liegt nahe beim tatsächlichen Wert (84,41 %), welcher si h aus der Aminosäurenanalyse ergibt. Es wird auch bestätigt, daß das Proteinkelat eine beträchtliche Menge an organischen Nicht-Proteinen, beispielsweise Kohlehydrate, enthält.

## T a b e l l e I a

0960/128602

Amino Säuren-Profil (g/100 g Protein)

Aminosäure	Neues Protein Chelat	Arginase Grassmann <sup>1</sup>	Catalase Rinderleber <sup>2</sup>	CO <sub>2</sub> -Anhydrase aus Blut <sup>2</sup>	saurer Glycoprotein Plasma <sup>2</sup>	Catalase aus Ratentleber <sup>3</sup>	Appo-Ferritin <sup>4</sup>	Erythrocyt <sup>2,5</sup>	Glutamin-Cyclo-transferase <sup>6</sup>
Alanin	4,83	7,14	3,41	3,08	3,20	5,88	1,9	4,75	2,02
Arginin	4,98	5,64	7,09	5,12	3,59	8,54	9,1	4,27	6,26
Asparaginsäure	8,41	10,78	9,86	11,58	8,45	14,89	6,8	7,86	10,19
Cystine/2	0,357	Nil	0,95	0,29	Nil	0,96	1,7	3,51	N.D.
Glutaminsäure	8,59	11,42	8,54	8,80	11,41	13,27	17,2	10,97	8,39
Glycin	4,15	9,85	2,48	3,73	1,52	4,36	3,4	7,85	4,16
Histidin	7,21	1,26	6,81	4,14	2,43	4,90	4,8	5,97	2,99
Isoleucin	3,85	3,53	3,31	1,45	4,10	4,26	1,4	3,74	6,47
Leucin	5,86	10,38	7,42	8,53	9,92	6,93	19,1	6,07	8,76
Lysin	9,78	10,87	8,66	6,50	4,60	7,45	7,8	7,86	6,65
Methionin	1,30	Nil	2,49	1,05	0,88	3,01	1,9	Nil	6,25
Phenylalanin	3,62	6,84	6,81	4,55	6,01	8,27	6,1	4,37	4,24
Prolin	3,05	Nil	3,83	4,54	2,95	7,95	1,5	3,25	2,27
Serin	0,55	6,82	2,57	4,21	3,93	4,29	4,3	5,18	2,96
Threonin	1,48	6,57	2,81	4,61	4,67	5,00	4,3	5,54	4,16
Tryptophan	1,348	Nil	3,26	3,16	Nil	2,64	1,2	0,34	N.D.
Tyrosin	2,98	2,94	6,12	4,01	2,25	5,67	5,0	0,95	5,50
Valin	7,18	5,88	5,20	4,01	3,60	6,76	4,3	6,87	4,57

<sup>1</sup>Grassmann et al., J. Physiol. Chem., 312, 273-85 (1958)<sup>6</sup>Nesser et al., C.R. Lab. Carlsberg, 35 (1)1-24 (1966)<sup>2</sup>Tristram et al., Adv. Protein Chem., 18, 227-318 (1963)<sup>7</sup>Mikrobiologisch bestimmt<sup>3</sup>Higashi T.J., BioChem (Tokyo) 56(4)361-3(Eng.)<sup>4</sup>Nach entfernen von Fe<sup>8</sup>Green et al., J. Biol. Chem., 155, S.1 (1944)  
modifiziert durch zweistündige Hydrolyse mit 10N NaOH<sup>5</sup>Nach Entfernen von Cu

\* Durchschnitt der mit HCl (16h), HCl (18h) und HCl (72h) erhaltenen Werte



T a b e l l e Ib  
Aminosäuren-Profil, Anzahl  
der Aminosäurereste pro Mol  
auf- bzw. abgerundet

Aminosäure	Neues Protein- Chelat	Lyso- zym aus Ei	Rin- der CO <sub>2</sub> - An- hydra- se B	Ribo- Nu- clease A	Car- boxy- Pepti- ase A	Tyro- sinase aus Neuro- spora	B-Lac- to- globu- lin AB	Colla- genase	Rinder- -Albumin	Tyro- sinase aus eß- baren Pilzen	Carboxy- Peptidase B
Alanin	19	12	17	12	20	24	29	97	48	56	22
Arginin	9	10-11	7	4	11	14	6	30	23	37	13
Asparagin- säure	21	21-23	32	15	28	31	31	85	57	114	26
Cystine-1/2	1	8	1	8	2	0	11	0	30	0	7
Glutamin- säure	19	5	23	12	26	22	49	68	77	102	24
Glycin	21	12	20	3	23	19	7	167	17	74	21
Histidin	15	1	11	4	8	6	4	36	18	26	7
Isoleucin	10	6	5	3	20	9	19	47	14	48	16
Leucin	15	8	26	2	24	24	43	61	65	68	20
Lysin	22	6	19	10	15	12	30	100	61	40	17
Methionin	3	2	3	4	3	2	8	Spur	4	17	6
Phenylalanin	7	3	11	3	16	17	8	35	28	48	12
Prolin	9	2	20	5	10	23	17	30	29	58	12
Serin	2	12	16	15	33	32	12	94	28	41	26
Threonin	4	7-8	15	10	27	16	16	75	34	59	26
Tryptophan	2	5-6	7	nicht be- stimmt	8	8	4-5	Nil	2	nicht be- stimmt	10
Tyrosin	5	3	8	6	19	12	8	39	19	33	22
Valin	21	6	20	9	16	17	19	66	35	52	14
Amid-NH <sub>2</sub>	13	18	26	17	19	nicht be- stimmt	30	nicht be- stimmt	39	nicht be- stimmt	23
Molekular- gewicht Metall	28500	15000	30000	13700	34400	33000	37700	104000	69000	119000	34000
	2-Me++	keines	1-Zn++	keines	1-Zn++	1-Cu++	keines	Ca++	keines	4-Cu++	Zn++

209821/0960

4

Tabelle I zeigt in typisches Aminosäureprofil eines Protein-Metall-Chelats der in Stammpatent Nr. .... definierten Art, welches ein Molekulargewicht von 32600 besitzt. Der theoretische Aminosäuregehalt dieser Probe (89,9 %), unter Zugrundelegung eines aus dem Aminosäureprofil und dem elementaranalytisch bestimmten Stickstoffgehalt berechneten Faktors (5,89), liegt nahe beim tatsächlichen Wert (88,1 %), welcher sich aus der Aminosäureanalyse ergibt. Auch hier bestätigt sich, daß das Proteinchelat eine beträchtliche Menge anorganischen Nicht-Proteinen, beispielsweise Kohlehydrate, enthält.

Tabelle Ic  
Aminosäureprofile

Aminosäure	Reste pro Mol (auf ganze Zahlen gerundet)	Reste g/100 g Protein*
Alanin	23	4,99
Arginin	11	5,07
Asparaginsäure	25	8,89
Cystin- <sup>1</sup> /2	1	0,36
Glutaminsäure	23	9,12
Glycin	25	4,29
Histidin	18	7,44
Isoleucin	11	3,98
Leucin	17	6,05
Lysin	26	10,10
Methionin	4	1,52
Phenylalanin	8	3,75
Prolin	11	3,15

2

## Fortsetzung Tabell I

Aminosäure	Reste pro Mol (auf ganze Zahlen gerundet)	Reste g/100 g Protein*
Serin	2	0,57
Threonin	5	1,52
Tryptophan	3	1,68
Tyrosin	6	3,09
Valin	24	7,41
Amidgruppen	(17)	(0,70)
Asche	2-4 (Me <sup>++</sup> )	0,2 - 0,5

\* Durchschnittswert erhalten durch Hydrolyse mit HJ (16 h),  
HCl (18 h) und HCl (72 h).

Der isoelektrische Punkt des neuen erfindungsgemäß isolierbaren Metallchelats eines Proteins liegt etwa bei einem pH-Wert von  $5,5 \pm 0,2$  und der isoionische Punkt bei  $7,92 \pm 0,2$ . Der isoelektrische Punkt wurde durch Elektrophorese auf Zelluloseacetat bei verschiedenen pH-Werten und unter Verwendung eines Zitrat-Phosphat-Puffers ermittelt. Die Transportwege betrugen -5,77 mm bei pH = 4,45, -4,67 mm bei pH = 4,85, -1,70 mm bei pH = 5,30, -0,50 mm bei pH = 5,45, 0 mm bei pH = 5,50, +2,90 mm bei pH = 6,05 und +4,90 mm bei pH = 6,55. Aus diesen Transportwegen ergibt sich der isoelektrische Punkt bei etwa pH = 5,5. Der isoionische Punkt wurde entsprechend Riddiford, J. Biochem. 239, 1079 (1964) bestimmt. Hierbei wurde das Protein zwecks vollständiger Entfernung von Elektrolyten gründlich dialysiert und anschließend lyophilisiert, worauf 25,8 mg des lyophilisierten

209821/0960

Produktes in 5 ml destilliertem Wasser gelöst und die resultierende Lösung in eine auf 25°C gehaltenen Zelle eingebracht wurde, in welcher sie unter Stickstoffatmosphäre so lange (etwa 40 bis 60 Minuten) belassen wurde, bis sich ein stabiler pH-Wert einstellte. Es ergab sich so ein isoelektrischer Punkt von etwa  $7,92 \pm 0,02$ .

Der isoelektrische Punkt und der isoelektrische Punkt des erfindungsgemäß isolierbaren Proteins liegen beträchtlich weit auseinander. Offenbar lagert sich das Protein vorzugsweise an jene Anionen an, welche in den Pufferlösungen enthalten sind, in welchen es selbst gelöst ist, so daß letzten Endes das isoelektrische Molekül nicht vom reinen Protein sondern von einem Salz mit den gebundenen Anionen gebildet ist.

Dieser Unterschied zwischen dem isoelektrischen Punkt und dem isoelektrischen Punkt ist bei den meisten Proteinen nicht die Regel, jedoch wurde bereits für Gelatine ein Unterschied zwischen isoelektrischen Punkt und isoelektrischem Punkt (D.S. Jackson, et al. Bioch. Biophys. Acta 26, 638, 1957) und für Enolase (B.G. Malmstrom et al. J. Biochem., 234, 1108, 1959) berichtet.

Im erfindungsgemäß isolierbaren Metallochelat eines Proteins überwiegen die freien basischen Gruppen (46 bis 55 vom Arginin, Lysin und Histidin stammende basische Gruppen) über die freien Säuregruppen (27 bis 31 von der Asparaginsäure und der Glutaminsäure stammende saure Gruppen, 13 bis 17 der 40 bis 48 sauren Gruppen der Asparaginsäurereste und Glutaminsäurereste sind in Amid-Bindung blockiert). Das Überwiegen der freien basischen Gruppen über die freien sauren Gruppen (das Verhältnis beträgt etwa 1,7 : 1 bis 1,8 : 1) ist der Grund für die Verschiebung

209821/0960

- 9 -

schiebung des isoelektrischen Punktes gegenüber dem isoelektrischen Punkt und stützt die Annahme, daß das isoelektrische Molekül ein Salz des Proteins und der daran gebundenen Anionen darstellt und es wird auch angenommen, daß dieser Umstand zumindest zum Teil zur einzigartigen physiologischen Wirksamkeit des erfindungsgemäß isolierbaren Proteins beiträgt.

Das Infrarotspektrum des erfindungsgemäß isolierbaren Metallchelats eines Proteins ist, bei pH = 7 bestimmt, typisch für Proteine. In der untenstehenden Tabelle sind die Ultraviolettabsorptionsspektren dieses Proteins bei pH = 1,5 in 0,05 n HCl, bei pH = 1,5 in 0,05 n HCl + 0,10 m KCl, bei pH = 7 in Wasser, bei pH = 7 in 0,05 m Phosphatpuffer und bei pH = 13 in 0,15 m KCl, wobei der pH-Wert mit 1 n KOH auf 13 eingestellt wurde, dargestellt.

M

# Ultraviolett - Absorptionsspektren des normen Proteinchelats

$\lambda$ / m	Optische Dichte				
	pH 1,5		pH 7,0	pH 7,0	pH 13,0
	$\gamma = 0,05$ 0,560 mg/ml	$\gamma = 0,15$ 0,434 mg/ml	$H_2O$ 1,00 mg/ml	Puffer 0,492 mg/ml	KCl - KOH 0,492 mg/ml
310	0,068	0,005	0,035	0,00	0,136
300	0,102	0,030	0,090	0,03	0,280
295	0,145	0,066	0,184	0,13	0,353
290	0,236	0,129	0,373	0,18	0,430
285	0,320	0,190	0,510	0,25	0,422
281	0,342	0,204	0,540	0,23	0,430
283	0,355	-	0,560	-	-
282	0,369	0,219	0,570	0,29	0,433
281	-	-	0,590	-	-
280	0,377	0,244	0,585	0,30	0,420
279	-	0,223	0,590	-	-
278	0,384	0,227	0,592	0,30	0,420
277	-	0,223	0,590	-	-
276	0,385	0,226	0,588	0,30	0,411
275	0,385	0,225	0,580	-	0,410
276	0,364	0,208	0,538	0,27	0,422
265	0,330	0,179	0,475	0,23	0,471
260	0,284	0,144	0,400	0,19	0,592
255	0,247	0,117	0,337	0,15	0,845
250	0,226	0,104	0,315	0,13	1,150
245	0,263	0,134	0,402	0,18	1,45
240	0,432	0,272	0,190	0,37	1,70
230	-	-	-	1,80	-

Die im sauren Milieu und im alkalischen Milieu ermittelten Absorptionsspektren des Proteinchelats sind beträchtlich verschieden von dem bei pH = 7 erhaltenen Absorptionsspektrum. In Anbetracht dieser Unterschiede können Ultraviolett-Differenzspektren dadurch bestimmt werden, daß die UV-Absorption des in

12

inem Test-Lösungsmittel g löst n Proteins geg n di UV-Absorpti n des mit gleicher Konzentration in einem Bezugslösungsmittel gelösten Proteins photometrisch bestimmt wird. Solche Differenzspektren sind bei der Beurteilung der Art des Einbaus aromatischer Aminosäuren und des Cysteins in Proteine wertvoll [siehe Wetlauf; Adv. Protein Chemistry, 17, 346 (1962), Riddiford et al., J. Biol. Chem. 239, 1029 (1964); 240, 168 (1965)] 7. Tryptophan und Tyrosin tragen hauptsächlich zur Absorption im Bereiche zwischen 270 bis 300  $\mu$ u bei. Auf Phenylalanin ist die Feinstruktur im Bereich um 250  $\mu$ u zurückzuführen; Phenylalanin absorbiert jedoch nicht oberhalb 270  $\mu$ u. Sowohl Tryptophan als auch Tyrosin und Cystein können zu einer Absorption im Bereiche von 235 bis 245  $\mu$ u beitragen. Bei 25°C wird im Spektrophotometer nach Hitachi-Perkin-Elmer Model No. 139 und unter Verwendung geschlossener (matched) Küvetten das UV-Spektrum bestimmt. Das Instrument wurde so kompensiert, daß sich bei allen pH-Werten eine flache Grundlinie ergab. Bei im alkalischen Bereich liegenden pH-Werten stellten sich die Endwerte rasch ein und blieben zwei Stunden konstant, während bei im sauren Bereich liegenden pH-Werten zwei Stunden erforderlich waren, um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen. Die Kurven ergeben sich aus unter den folgenden Bedingungen erhaltenen Meßwerten:

- 12 -

209821/0960

(Konzentration des Proteins: 0,502 mg/ml)

Kurve A<sub>1</sub> Vergleich: 0,05 m K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,1 m KCl; pH 7,0  
 Probe: 0,1 m KCl + 0,05 m KCl; pH 1,5

Kurve A<sub>2</sub> Vergleich: 0,05 m K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,04  
 Probe: 0,05 m HCl; pH 1,5

(Konzentration des Proteins: 0,492 mg/ml)

Kurve B, Vergleich: 0,05 m K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,1 m KCl; pH 7,06  
 Probe: 0,15 m MKCl + m KOH; pH 13

Bei pH = 13 scheinen alle Tyrosinreste des Proteins dem Lösungsmittel frei zugänglich zu sein und damit augenblicklich zu ionisieren, während bei einem pH-Wert von 1,5 sogar bei einer Ionenkonzentration von 0,05 m die Tyrosinreste teilweise dem Zugriff des Lösungsmittels entzogen sind. Das Proteinmolekül zeigt sich somit im alkalischen Milieu stärker aufgefaltet.

Im sauren Milieu ist das Protein bei einem pH-Wert von 5,5 zum Teil unlöslich, jedoch beginnt es sich bei einem pH-Wert von 2 wieder aufzulösen. Bei einem pH-Wert von 1,5 wird das Protein wieder zur Gänze gelöst. Bei Bestimmung des Differenzspektrums im sauren Milieu sind die Absorptionsmaxima im Bereich von 292 bis 294 mμ auf Tryptophan und jene im Bereich von 285 bis 287 mμ auf Tyrosin und zum geringen Teil auf Tryptophan zurückzuführen, während Phenylalanin Änderungen in der Feinstruktur von 250 bis 265 mμ bewirkt. Es ergibt sich ein auffälliger Unterschied zwischen den im sauren Milieu bei Ionenkonzentrationen von 0,05 m und 0,15 m ermittelten Differenzspektren. Bei einer Ionenkonzentration von 0,05 m finden sich von 280 bis 296 mμ keine ausgeprägten Absorptionsmaxima, jedoch zeigt sich bei 294 bis 296 mμ ein Plateau und in breiter Schulter von 285 bis 290 mμ vor, während

-13-

209821/0960

BAD ORIGINAL



M

bei 280 bis 282 $\mu$  ein niedriges Plateau liegt. Bei einer Ionenkonzentration von 0,15 m zeigt sich bei 294 bis 296 $\mu$  weder ein Absorptionsmaximum noch ein Plateau, sondern ein breites welliges Plateau im Bereiche von 278 bis 285 $\mu$  mit einer Schulter bei 286 bis 290 $\mu$ .

Es besteht Grund zur Annahme, daß bei einem pH-Wert von 1,5 das Plateau bei 292 bis 296 $\mu$  auf Umlagerungen der zwei Tryptophanreste im Molekül des Proteins zurückzuführen ist. Die Schulter bei 287 bis 290 $\mu$  wird wahrscheinlich zum Teil durch die Tyrosinreste im Molekül erzeugt. Bei einer Ionenkonzentration von 0,15 m scheinen die Tryptophanreste nahezu vollkommen abgeschirmt zu sein, was bei einer Ionenkonzentration von 0,05 m nicht der Fall ist. Die bei beiden Ionenkonzentrationen erhaltenen Spektren sind hinsichtlich der auf Tyrosin zurückzuführenden Absorptionsmaxima ziemlich abnormal. Das bei anderen Proteinen übliche Absorptionsmaximum bei etwa 285 $\mu$  fehlt bei einer Ionenkonzentration von 0,15 m völlig und ist bei einer Ionenkonzentration von 0,05 m zu einer schwachen Schulter degeneriert. Aus der Absorptionskurve von 284 bis 288 $\mu$  ergibt sich, daß die Tyrosinreste im Molekül des Proteins gut eingehüllt sind und damit dem Angriff des Lösungsmittels entzogen sind.

Bei der Gelscheiben-Elektrophorese auf Polyacrylamid und der Dünnschicht-Elektrophorese auf Agarose gibt das Protein-Metall-Chelat ein typisches Bild mit drei nahe beieinander liegenden Bändern. Die Dünnschicht-Elektrophorese ist von R.E. Phillips und F.R. Elevitch, Progress in Clinical Pathology, 1966, Seiten 62 bis 153, beschrieben worden.

- 16 -

Die Gelscheiben-Elektrophorese auf Polyacrylamid

- 14 -

209821/0960

beruht auf den Arbeiten von Ornstein und Davis, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 und 404 (1964) und von William und Reisfeld, Nature 195, 281 (1962), wobei bei der besseren Auflösung, zwischens Erzielung scharfer Banden und zwischen Erzielung verlässlicher Fließbedingungen verschiedene Abänderungen getroffen wurden.

Es wurden unter anderem folgende Versuchsbedingungen eingehalten:

pH 9,4

- 1) Vorbehandlung: 2 mA pro Rohr während 1,5 Stunden bei konstantem Strom, nur fließendes Gel.
- 2) Elektrophorese: 5 mA pro Rohr während 50 Minuten bei konstantem Strom, für 12 Rohre daher 60 mA, 140 V zu Beginn bis 320 V am Ende.
- 3) Anfärben: 16 Stunden in einem Gemisch aus 10 % Eisessig, 20 % Methanol und 70 % Wasser, wobei das Gemisch pro 100 ml 15 mg Amide-Black gelöst enthielt.
- 4) Entfärben: 12,5 mA pro Rohr und Stunde bei konstantem Strom.

pH 8,8

- 1) Vorbehandlung: keine
- 2) Elektrophorese: 6 mA pro Rohr und Stunde bei konstantem Strom, für 12 Rohre daher 72 mA, 100 V zu Beginn bis 160 V am Ende.
- 3) Anfärben: 16 Stunden in der oben angegebenen Lösung.
- 4) Entfärben: 5,5 mA pro Rohr und Stunde bei konstantem Strom.

-15-

209821/0960

Typische Elektrophorogramme des Metallchelats des Proteins enthält die untenstehende Tabelle, in welcher sämtlich Werte Näherungswerte darstellen.

	pH 9,4			pH 3,0		
	Breite in mm	Abstand vom Ur- sprung in mm	Relative Intensi- tät in %	Breite in mm	Abstand vom Ur- sprung in mm	Relative Intensi- tät in %
oberes Band	1,0	11,5	100	1,2	16,5	100
mittleres Band	1,0	14,0	89-93	0,4	20,0	53-55
unteres Band	0,5	18,0	48-52	1,2	22,0	94-96

<sup>1</sup>oberer Rand, Gesamtlänge des fließenden Gels: 56 mm

Die Dünnschicht-Elektrophorese auf Agarose wurde in 0,05 M Tris-glycin-Puffer bei einem pH-Wert von 8,45 während 30 Minuten und bei einem konstanten Strom von 5 mA durchgeführt, wobei zu Beginn die Spannung etwa 185 bis 195 V betrug und gegen Ende die Spannung um etwa 20 V höher war. Die Platten wurden entsprechend den Angaben in der erwähnten Literatur behandelt und gefärbt.

Im Hinblick auf die offensichtliche Einheitlichkeit des erfindungsgemäß isolierbaren Metallchelats eines Proteins, wie sie sich beim Ultrazentrifugieren, bei der Gelfiltration, beim Chromatographieren über Ionenaustauschharzen, wie DEAE-Sephadex, aus dem Aminosäurenprofil usw. ergibt, wird angenommen, daß die sich bei der Gelscheibenelektrophorese zeigenden typischen drei Banden auf eine Aufspaltung einer Bande zurückzuführen ist, welche Aufspaltung Pufferwirkung im elektrischen Feld zugeschrieben werden kann und nicht auf die Anwesenheit dreier verschiedener Proteine im Metallchelat des Proteins hin-

209821/0960

- 16 -

weist. Bei der Gel elektrophorese bewegt sich das erfindungsgemäß isolierbare Protein langsamer als Albumin und schneller als  $\gamma$ -Globuline.

Beim Ultrazentrifugieren bewegt sich das erfindungsgemäß isolierbare Protein in Form eines einheitlichen, scharfen Bandes weiter, wobei der Sedimentationskoeffizient etwa  $3,72 \pm 0,05$  Svedberg-Einheiten beträgt.

Im folgenden sind einige weitere Kennzahlen des im Stappatent Nr. ....definierten Protein-Metall-Chelats bzw. des erfindungsgemäß erhältlichen Protein-Metall-Chelats angegeben.

Molekulargewicht	$32200 \pm 1000$
aus Gelfiltration	32500
" Sucrose-Dichtegradient	$32600 \pm 950$
" Aminosäureprofil	$33500 \pm 1000$
" Osmotischem Druck	32900
Sedimentationskoeffizient (physiologische Kochsalzlösung)	$3,72 \times 10^{-13}$
Isoelektrischer Punkt, Zitrat- -Phosphat-Puffer	$5,5 \pm 0,2$
Isoionischer Punkt	$7,92 \pm 0,02$
Absorption, $A_{280}^{1\%}$	$6,2 \pm 0,2$
Intrinsische Viskosität ml/g	3,55
Partielles spezifisches Volumen ml/g	0,742
Friktionsverhältnis	1,17 <sub>4</sub>
Scheraga-Mandelkern-Koeffizient, B	$2,22 \times 10^6$
Länge des äquivalenten Ellipsoids in Å	110 bis 160
schwer austauschbarer Amid-Wasserstoff	> 80 %
Elektronenspinresonanz	
Hauptresonanz ( $Cu^{++}$ ), Gauß	3250

Das erfindungsgemäß isolierbare Protein liegt zumindest zum Teil in Form eines Metallchelats vor, u.zw. enthält es zwei Proteine  
2 bis 4 Metallatome pro Proteinmolekül. Der Metallgehalt des /

209821/0960

18

sansten erwiesen sind in Proben liegt der Metallgehalt zwischen 0,25 und 0,75 %. Das Ausmaß der pharmakologischen Wirkung des Metallchelates scheint zumindest zum Teil von der Anwesenheit eines oder mehrerer physiologisch wesentlicher zweiwertiger Metallionen im Chelat abzuhängen. Aus diesem Grunde werden in das Metallchelat vorzugsweise zumindest 65 %, besser mindestens 75 %, und insbesondere 85 % Metall eingebracht u. zw. in Form mindestens eines der Metalle Mg, Ca, Fe, Zn und Cu. Zwecks Herstellung von Metallchelaten höchster Wirksamkeit wird dafür gesorgt, daß zumindest 40 % des Metallgehaltes von einem zweiwertigen Metall mit einem Ionenradius von 0,65 bis 0,79 Å, beispielsweise Magnesium, gebildet sind. Solche Metalle können beispielsweise dem Buch von Hall, "Chemistry and Physics," 44. Auflage, Seiten 3507 bis 3508 (1982) entnommen werden. In den meisten solchen Chelaten ist eines dieser Metalle auch das vorwiegende Metall. Unter dem "vorwiegenden Metall" ist hierbei jenes chelatierende Metall zu verstehen, welches im Proteinchelat mit dem höchsten Anteil enthalten ist. Obwohl in den die stärkste Wirkung zeigenden Metallchelaten des Proteins der größte Teil des Metallgehaltes auf physiologisch wesentliche zweiwertige Metalle zurückzuführen ist, enthalten typische Metallchelate auch andere Metalle.

Diese weiteren Metalle werden häufig während der Isolierung des Proteins von diesen aufgenommen u. zw. insbesondere dann, wenn der Gesamtmetallgehalt des Proteins relativ niedrig ist. Dies kann dann vermieden werden, wenn das Protein in einer Pufferlösung verwahrt wird, die ein physiologisch wesentliches zweiwertiges Metall in einer die

Aufnahme von Fremdmetallen durch das Protein ausreichend haben  
Konzentration als Kationen enthält und/oder wenn das Protein nur  
mit Anlagenteilen in Berührung kommt, die keine solchen Metalle ent-  
halten.

In den wirksamsten Chelaten sind weniger als 10 % der insgesamt vorhandenen Metalle physiologisch unwesentliche Metalle, beispielsweise Al, Si und B. Ein zu geringer Gehalt des Protein-Metall-Chelats an physiologisch wesentlichen 2-wertigen Metallen ist nachteilig für die Wirksamkeit dieses Chelats. Einwertige Metalle, beispielsweise Natrium und Kalium, und Zellgifte darstellende Metalle, beispielsweise Blei, Chrom, Selen usw., sind im Metallchelat selbst vorzugsweise höchstens in Spuren anwesend.

Auf Grund der bisher gemachten Feststellungen muß geschlossen werden, daß  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  und  $\text{Zn}^{++}$  eine entscheidende Rolle dabei spielen die Struktur des nativen Proteins zu bewahren, diese Metallionen können als "Sperrstifte" angesehen werden, die intramolekulare Quervernetzungsbrücken bilden und damit das Molekül zusammenhalten; diese Metallionen tragen somit zur Stabilität des Proteins bei, machen das Protein immun gegen die meisten proteolytischen Enzyme und sind der Grund für zahlreiche der pharmakodynamischen Funktionen des Proteins.

Beim Verfahren gemäß Stammpatent wird das erwünschte Protein zumindest teilweise gereinigt, vorzugsweise isoliert, während es in Form eines Metallchelats vorliegt, dessen vorwiegend vorhandenes Metall einen Ionenradius von 0,65 bis 0,79 Å besitzt. Wenn ein Chelat isoliert vorliegt, dessen vorwiegend vorhandenes Metall einen kleineren oder größeren Ionenradius besitzt (beispielsweise Mangan mit dem Ionenradius 0,80 Å oder Calcium mit dem Ionenradius 0,99 Å), so kann dies auch durch

209821/0960

BAD ORIGINAL

Transchelatisierung in ein Chelat übergeführt werden, dessen vorwiegend vorhandenes Metall einen Ionenradius von 0,65 bis 0,79 Å besitzt. Bei einer solchen Transchelatisierung wird das umzuwandelnde Chelat mit einem Überschuß einer wasserlöslichen Salz des erwünschten Metalles enthaltenden Pufferlösung behandelt, wobei das Verhältnis von Metallion zu Protein so eingestellt wird, daß das Protein in der gewählten Pufferlösung als Metallchelat eines solchen Metalles verbleibt.

In zahlreichen Quellen natürlicher Eiweißstoffe sind Spuren der natürlichen Vorstufe des erfindungsgemäß isolierbaren Produkt enthaltenen Proteins enthalten. Solche Quellen können tierische Organe bzw. Gewebe, beispielsweise Leber, Niere, Hoden, Pankreas, Placenta, Darmschleimhaut, Thymus, Lunge, Milz von Kaninchen, Schafen, Rindern, Schweinen und Menschen, Meerestieren, Flunder, Heilbutt, Schwertfisch, Muscheln, Hummer, Auster, sein. Auch pflanzliche Eiweißquellen, wie Samen, Weizenkeimlinge ungeschälter Reis, Sojabohnen, Lima und Jackbeans sind brauchbar. Auch essbare Pilze und Mikroorganismen, wie Fungi und Bakterien sind brauchbar. Beispiele hierfür sind Hefe, E.Coli, Cl. Hystolyticum, Cl. Kluyveri, Cand. Mycoderma, Cl. Welchii und Achrom. Fisherii. Da die natürliche Vorstufe des erfindungsgemäß isolierbaren Produkts labil ist, soll mit der Isolierung sobald als möglich nach Gewinnung der Eiweißquelle begonnen werden.

Ein Protein-Metall-Chelat der im Stammpatent definierten Art kann gemäß der Erfindung dadurch stabilisiert werden, daß aus dem Chelat und (a) Surose, oder (b) inner Pentose, in der Hexose der einer Haptose mit in der Hydroxygruppe an einem

ein r fr ien Carb nylgrupp in r Ket grupp an oder iner Ald hydgruppe benachbart n Kohlenstoffatom und in in r räumlich d n zwei Hydroxygruppen an den nächst folgenden Kohlenstoff- atomen gegenüberliegenden Stellung, oder (c) Alkylacetalen von Pensosen, Hexosen oder Heptosen, oder (d) Glucose, oder (e) Mannose ein Gemisch hergestellt wird. Unter anderem betrifft die Erfindung die Herstellung von bei Raumtemperatur lagerfähigen wässerigen Lösungen und gefriergetrockneten Präparaten eines solch n M tallchelats, beispielsweise die Herstellung steriler injizier- barer Lösungen und die Herstellung gefriergetrockneter und in einem Behälter dicht eingeschlossener steriler Mischungen, die nach längerer Lagerung in eine injizierbare Form gebracht w rden können. Gemäß einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird eine Lösung des Proteins, welche ein Saccharid d r angegebenen Art enthält, getrocknet. Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Protein-Metall-Chelat in Gegenwart eines Saccharids der ang- gegebenen Art gereinigt.

Es ist Gegenstand der Erfindung ein gefriergetrocknetes Protein der angegebenen Art in Form eines Gemisches mit Sucrose oder einem anderen stabilisierend wirkenden Saccharid h rzustellen. Es ist weiters Gegenstand der Erfindung ein solches Gemisch in fester Form, insbesondere in steriler Form h rzustellen. Einweiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herst llung einer solchen Mischung in Form einer sterilen injizierbaren Lösung. Es ist w it rs G g nstand der Erfindung solche feste, steril Mis hungen hermetisch in in n Behält r

209821<sup>21</sup>0960

BAD ORIGINAL



ingeschlossen zu schaffen um aus einer solchen Mischung ein injizierbares Präparat herstellen zu können. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Schaffung einer in einem Behälter eingeschlossenen sterilen, injizierbaren Lösung des Metallchelates, welche vor Verwendung gelagert werden kann. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Reinigen und Gefriertrocknen eines solchen Proteins in Gegenwart eines Saccharids der angegebenen Art um eine Zerstörung des Proteins zu vermeiden.

Das Protein-Metall-Chelat der im Stamm Patent Nr. .... angegebenen Art ist in reiner Form instabil. Beispielsweise ist ein teilweiser Abbau des gereinigten Proteins während des Gefriertrocknens zu beobachten, u.zw. unabhängig davon wie hier bei im einzelnen vorgegangen wird. Ein solches Verhalten ist für rein Proteine durchaus nicht ungewöhnlich und es wurde bereits von verschiedenen andersartigen Proteinen berichtet, daß sie nach Erreichen eines bestimmten Reinheitsgrades Zersetzungen erleiden. Dies gilt insbesondere für unstarre Proteine, das sind solche Proteine, die nicht durch intramolekulare kovalente Bindungen, beispielsweise S-S-Brücken, zusammengehalten werden.

Es ist bereits bekannt, daß Proteine hohen Reinheitsgrades am besten durch geringe Mengen anderer Proteine, beispielsweise Albumin, stabilisiert werden können. Andere hochmolekulare, lösliche Verbindungen biologischer Herkunft, wie maritime Kollide (Carrageenin), Stärke, Dextrin und andere Polysaccharide und Phospholipide wirken gleich gut. Da nun aber das gemäß der vorliegenden Erfindung bzw. das gemäß dem Stamm Patent Nr. ....

rhätlich Protein auf dem Injektionsweg verabreicht wird, sind alle diese Stoffe für Stabilisierungszwecke deshalb ungeeignet, weil sie Allergie erzeugen, nicht isoton sind und in einigen Fällen stark toxisch wirken. Darüber hinaus wird durch Fremdproteine und/oder Lipoproteine die biologische Wirksamkeit des im Stamm Patent Nr. .... definierten Proteins verringert, was häufig der wichtigste Grund für die Unbrauchbarkeit solcher Stoffe ist.

Ähnliche Einschränkungen gelten auch für andere bereits für die Stabilisierung von Proteinen mit Erfolg angewendete Stoffe, wie Nucleotide, Glutathion und andere Thiole und Sulfite. Zur Stabilisierung von Proteinen wurden auch übliche Pufferlösungen, Terpene, Polykationen und Polyanionen verwendet. Beispiele für Polykationen sind Protamin-Sulfat, Polylysin, Polyvinylamid und 1,10-Diaminodecan. Beispiele für Polyanionen sind sulfuriertes Polystyrol, Polyvinylsulfat, Natrium-Dodecylsulfat, Dextran-Sulfat u.dgl. P. Burnfield et al., Arch. Biochem. Biophys., 111, 31 (1965) bringt typische Beispiele für die Verwendung von Polykationen und Polyanionen für die Stabilisierung von verschiedenen Proteinen hohen Reinheitsgrades. Obwohl verschiedene der erwähnten Verbindungen zur Stabilisierung des neuen Proteins an sich verwendet werden könnten, sind/dennoch wegen ihrer Toxizität, wegen der Erzeugung von Allergie und wegen mangelnder Isotonie unbrauchbar für den vorliegenden Zweck. Von Wakid und Mansur ist in J. Med. Pharmacol., 1, 53 (1965) über die Schutzwirkung von Hexose-Phosphaten, Nucleotiden, Glutathion und

209821/0960

Q4

Sulfat- d r Ph sphationen, entweder all in d r vorzugsw is in Kombination angewendet, auf Phosphofructokinase berichtet worden. Die Überprüfung der Methode von Wakid und Mansur auf ihre Eignung für den vorliegenden Zweck lieferte jedoch negative Ergebnisse. Die Nucleotide, welche sich zwar zum Teil als wirksam erweisen, müssen zur Erzielung einer Stabilisierungswirkung in mindestens der fünffachen Gewichtsmenge, bezogen auf das neue Protein, verwendet werden, weshalb, abgesehen von den Kosten, diese Stoffe wegen fehlender Isotoni und wegen der Erzeugung von Allergie als Stabilisatoren nicht in Frage kommen. Glutathion kann nicht verwendet werden, da es mit dem neuen Protein unter Verringerung der Löslichkeit und der Wirksamkeit desselben reagiert. Von den verschiedenen Hexose-Phosphaten wirkt das Fructose-1,6-diphosphat am besten, weshalb das Fructose-1,6-diphosphat zwar im Prinzip verwendet werden könnte, jedoch wegen seines hohen Preises wieder nicht in Frage kommt. Die durch Fructose-1,6-diphosphat erzielbare Stabilisierungswirkung für das neue Protein ist nun gebunden an die gleichzeitige Anwesenheit von Glutathion, Mercaptoethanol und anorganischen Ionen, welche Stoffe diese Kombination für die Stabilisierung des neuen Proteins wertlos machen. Die Feststellung der genannten Autoren, daß freie <sup>bei</sup> Monosaccharide selbst/einer Konzentration von  $10^{-2}$  molar bzw. bei einem 250-fachen Überschuß an Stabilisator gegenüber dem Protein keine Stabilisierungswirkung ergeben, spricht überhaupt gegen die Verwendung v n Zuck rn als Stabilisat ren für das neu Protein.

Es sind bereits verschieden Saccharide in Kombination mit  
 weißhaltigen Stoffen verwendet worden. Beispielsweise wurde  
 Glycerin mit Tri-Kresol als Bakteriostatikum für Sarcin-Antigen  
 verwendet. Vitamin A und andere leicht oxydierbare Verbindungen  
 niedrigen Molekulargewichts sind bereits dadurch gegen Oxy-  
 dation geschützt worden, daß aus diesen Verbindungen und  
 Polysacchariden hohen Molekulargewichts, z.B. Dextrin und Stärke,  
 Einschlußverbindungen hergestellt worden sind. Ein für intra-  
 venöse Verabreichung bestimmtes Proteinhydrolysat ist bereits  
 durch ein Gelatinehydrolysat stabilisiert worden. Trypsin wurde  
 bereits in lösliche Form gebracht und stabilisiert mittels  
 Mischungen von Polyäthylenglykol, pflanzlichem Gummi, Zucker-  
 alkoholen, löslichen Stärken, löslichen Zellulosederivaten,  
 Dextrose, Lävlulose, Inosit, Arabinose und  $\beta$ -Lactose. Injizierbar  
 Pharmazeutika niedrigen Molekulargewichts wurden bereits dadurch  
 mit einer Depotwirkung ausgestattet, daß sie mit Fibrinogen Kombi-  
 niert wurden, welches nach Injektion koaguliert und damit die  
 Depotwirkung erzeugt, wobei Glycerin verwendet wurde um eine  
 Koagulation vor Injektion zu vermeiden. Masernvaccine wurden  
 bereits mit große Mengen an Lactose enthaltende Mischungen von  
 Lactose und Glutamat stabilisiert. Bacilli Calmette-Guerin-  
 -Vaccine wurde bereits mit Dextran stabilisiert. Polio-Vaccine  
 wird üblicherweise zwecks oraler Verabreichung in einem Stück  
 Würfelzucker absorbiert. Vaccinia Virus (Pox)-Vaccine ist  
 bereits durch Zusatz einer Mischung von Lactose und Calciumlacto-  
 bi nat stabilisiert worden. Zur Stabilisierung in s Mas ern-  
 Vaccin a wurde bereits Sorbit verwendet. Für par nt ral

Injektion bestimmte Präparate von Chlormiazepoxyd sind bereits in einem Maleinsäure, Polyoxyäthylen bzw. OH-Gruppen aufweisenden Verbindungen mit 2 bis 6 C-Atome, wie Glycerin, Propylenglyk l, Sorbit oder Glucose, enthaltendem Medium dispergiert worden.

Es wurden somit bereits viele Verbindungen stark verschiedener Struktur mit wechselndem Erfolg als Stabilisatoren für verschiedene Proteine verwendet. Es existiert jedoch keine allgemeine Regel, welche auf die Brauchbarkeit irgend eines Stoffes schließen läßt. Für jedes Protein ist eine andere Art eines Stabilisators erforderlich. Ein sich für ein Protein als Stabilisator als äußerst wirksam erweisender Stoff ist häufig für ein anderes Protein als Stabilisator völlig ungeeignet.

Im Stammpatent Nr. .... ist ein neues injizierbares Protein-Metall-Chelat beschrieben, das überragende pharmakologische Wirksamkeit besitzt. Dieses Metallchelate wird im Rahmen eines Verfahrens erhalten, bei welchem das Chelat g g benenfalls gefriergetrocknet wird. Das Protein ist nun wäh r nd des Gefriertrocknens in hohem Maße der Gefahr eines Abbaues ausgesetzt. Darüber hinaus sind auch wässrige Lösungen d s Proteins, aber auch das gefriergetrocknete Protein selbst b i Raumtemperatur nicht ausreichend lange lagerbeständig (die Lagerbeständigkeit beträgt nur kurze Zeit). Dies stellt nun vom wirtschaftlichen Standpunkt aus einen ernsten Nachteil dar. Der Preis des isolierten Proteins ist äußerst hoch, da bezogen auf das Trock ng wicht d r natürlichen Eiweißes, nur Ausbeuten von 0,01 % erzielt werden. Der beim Gefrier-trocknen d s g r inigt n Proteins intr t nd Verlust von 25 % oder mehr ist s mit äußerst schwerwiegend. Darüber

hinaus ist das während des Gefrieretroknens oder während der Lagerung bei Raumtemperatur dehydriert. Protein unlöslich, weshalb die aus dem Protein zu Injektionszwecken bereitete Lösung vor Verwendung filtriert werden muß, so daß die Verwendung des Proteins schwierig wird.

In erfindungsgemäßer Weise hergestellte gefriergetrocknete Mischungen des Protein-Metall-Chelats der angegebenen Art und Sucrose oder einem anderen Saccharid der angegebenen Art sind in der Regel völlig frei von unlöslichem Protein und können ohne weiteres zur Herstellung klarer Lösungen verwendet werden. Es ist weiters von Wichtigkeit, daß sowohl trockene Mischungen als auch Lösungen des neuen Proteins und des zu Stabilisierungszwecken verwendeten Saccharids bei Raumtemperatur bis zu Temperaturen bei 37°C über wesentlich längere Zeiträume lagerfähig sind als dieses Protein allein oder Mischungen dieses Proteins mit Sacchariden anderer Art als der angegebenen Art. Erfindungsgemäß herstellbare Mischungen bedingen somit einen beachtlichen technischen Fortschritt gegenüber dem gemäß Stammpatent Nr. ....erhältlichen gefriergetrockneten reinen Protein.

Es wurde gefunden, daß lediglich gewisse wasserlösliche Polyhydroxyverbindungen überraschend wirksame Stabilisatoren für ein im Stammpatent Nr. .... definiertes Protein-Metall-Chelat darstellen. Diese Polyhydroxyverbindungen schützen das Protein gegen Abbau nicht nur während des Abtrennens desselben von weiteren in den natürlichen Rohstoffen enthaltenen Proteinen sondern erhöhen auch die Beständigkeit des reinen Proteins gegen Veränderung während des Lagerns bei Temperaturen

obwohl 4 C, gleichgültig, ob das Protein in Form einer Lösung oder in Form eines festen Körpers vorliegt. Insbesondere der letztere Umstand ist von Wichtigkeit, da es damit möglich wird, das isolierte Protein, insbesondere im gefriergetrockneten Zustand bei Raumtemperatur zu lagern und zu verwenden, was beim reinen Protein nicht möglich ist.

Die zur Stabilisierung des Protein-Metall-Chelats verwendeten Saccharide liefern mit wenigen Ausnahmen beim Gefrier-trocknen einer Lösung des verwendeten Saccharids und des Protein-Metall-Chelats ein körniges gefriergetrocknetes Produkt. Verwendbare Saccharide sind (a) Sucrose, (b) Aldo- und Ketopentosen, -hexosen und -heptosen, welche durch Alkylgruppen, beispielsweise Methyl-, Äthyl- oder andere niedere Alkylgruppen acetalisiert sind, wie dies beispielsweise für das Methylglucosid und das Methylgalaktosid gilt, (c) Aldo- oder Ketopentosen, -hexosen und -heptosen, in welchen die der freien Carbonylgruppe benachbarte Hydroxylgruppe räumlich entgegengesetzt orientiert ist zu den Hydroxygruppen an den beiden unmittelbar folgenden Kohlenstoffatomen, wie dies für Galactose, Fructose, Fucose, Arabinose, Aldose Galactoheptulose, Sedoheptulose usw. gilt, (d) Glucose, und (e) Mannose. Eine Aufzählung von Sacchariden, darunter den oben angegebenen Polyhydroxyverbindungen, ist von Kirk und Othmer in "Inc.Chem.Tech., International Pub.", (1954) Bd. 13, Seiten 228-236 angegeben. Es wurde zunächst angenommen, daß nicht-reduzierende Zucker wegen der bekannten

Maillard("Browning")-Reaktion reduzierenden Zuckern überlegen sein müßten. Die Maillard-Reaktion wurde häufig beim Gefrier-

tro kann basischer Protein in Gegenwart reduzierender Zucker beobachtet, wobei im Hinblick auf die Wechselwirkung zwischen  $\epsilon$ -Amingruppen (Lysin) mit Ketogruppen der reduzierenden Zucker braune, unlösliche Produkte entstehen. Da das erfindungsgemäß isolierbare neue Protein reich an Lysin ist, einen isoelektrischen Punkt bei  $\text{pH} = 7,9$  besitzt und zwecks Beibehaltung seiner Struktur einen alkalischen pH-Wert benötigt, wurde zunächst angenommen, daß die Maillard-Reaktion unvermeidlich wäre und es damit unmöglich wäre reduzierende Zucker als Stabilisatoren zu verwenden.

Nun wirken überraschenderweise zwei reduzierende Zucker, u.zw. Galactose und Fructose, als ausgezeichnete Stabilisatoren, wogegen zwei nicht-reduzierende Zuckeralkohole, u.zw. Sorbit und Mannit, und auch der nicht-reduzierende Inositol als Stabilisatoren geringere Wirksamkeit besitzen. Dieses Phänomen scheint auf die sterische Konfiguration der Stabilisatoren zurückzuführen zu sein. Sowohl Fructose als auch Galactose besitzt an einer Seite des Moleküls zwei benachbarte Hydroxygruppen, wobei diese beiden Hydroxygruppen der funktionellen Gruppe, d.h. die Aldehyd- oder die Ketogruppe, nicht benachbart sind. Diese sterische Anordnung mag es dem Zuckermolekül ermöglichen sich relativ zum Proteinmolekül derart anzuordnen, daß die  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinreste sterisch an einer Reaktion mit der Aldehydgruppe oder der Ketogruppe des reduzierenden Zuckers gehindert sind.

In einem Disaccharid ist die sterische Anordnung der Zuckermoleküle ein solches, daß in derartigen Ansichten der beiden Hexosen wenig wahrscheinlich ist, was die geringere Wirksam-



keit von Maltose und Lactose vorstündlich macht, welche ebenfalls reduzierende Zucker sind. Sucrose ist ein nicht-reduzierendes Saccharid, weshalb hier wegen des Fehlens einer freien Carbonylgruppe die sterische Konfiguration nicht wesentlich ist. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese erweisen sich Fructose und Arabinose als sehr wirksam; ihre sterische Anordnung ist analog der sehr wirksamen Galactose.

Zur Beurteilung der Stabilisierungswirkung eines Saccharids ist die Absorption ( $\Delta A_{280}$ ) bei 280 m $\mu$  von Interesse. Je höher der Wert für  $\Delta A_{280}$  ist, umso stärkere Veränderungen des Proteins sind zu erwarten. Dies soll besagen, daß der Grad der in Gegenwart eines bestimmten Zuckers zu erwartenden Veränderung des Proteins durch Absolutwerte von  $\Delta A_{280}$  angekündigt wird; die Veränderungen im nativen Proteinmolekül sind zunächst geringfügig. In einigen der Disaccharide und in zwei Zuckeralkoholen ist die Tendenz dieselbe, obwohl die Absolutwerte deshalb nicht ganz verlässlich sind, weil durch die Trübung der Lösung in verlässliche Bestimmung von  $\Delta A_{280}$  nicht möglich ist. In keinem Stabilisator enthaltenden Präparat des Protein-Metall-Chelats kann  $A_{280}$  wegen der in der trüben Lösung vorliegenden Flecken nicht bestimmt werden.

Das Aussehen des mit Galactose, Fructose oder Sucrose (diese werden bevorzugt verwendet) stabilisierten gefriergetrockneten Proteins ist eher körnig als flockig. In dieser Weise stabilisiertes Protein löst sich in Wasser und üblichen Pufferlösungen ungewöhnlich leicht, wobei eine vollkommen klare Lösung erhalten wird. Die Lösungsgeschwindigkeit des so stabilisierten Proteins ist beträchtlich größer als die des nicht stabilisierten Proteins.

Bei Verwendung der angegebenen Saccharide, insbesondere Sucrose, Galactose oder Fruktose, als Stabilisator n wird auch die Standzeit von Lösungen des Proteins erhöht. Bei einer Temperatur von  $4^{\circ}\text{C}$  wurde eine Lösung von 2 Teilen Sucrose pro Teil Protein in isotoner Kochsalzlösung mit einer Lösung des Proteins in isotoner Kochsalzlösung verglichen. Beide Lösungen wurden periodisch überprüft, wobei sowohl  $A_{280}$  bestimmt als auch auf Trübung geprüft wurde. Nach Ablauf einer Woche war die keine Sucrose enthaltende Lösung bereits etwas trüb und sowohl durch Bestimmung von  $A_{280}$  als auch durch Bestimmung des Trockengewichtes war auf einen Verlust von 15 bis 20 % Protein zu schließen. Die Sucrose enthaltende Lösung war selbst nach drei Wochen noch völlig klar und sowohl für das Trockengewicht als auch für  $A_{280}$  waren die zu Versuchsbeginn festgestellten Werte mit innerhalb der Fehlergrenzen liegender Genauigkeit unverändert. Lösungen die zwei Teile Maltose bzw. Dextrin pro Teil Protein enthielten, zeigten während einer Woche oder mehr die gleiche Stabilität.

Ein Gewichtsteil oder weniger Zucker pro Gewichtsteil Protein scheint zur Erzielung einer optimalen Stabilisierungswirkung unvermeidlich zu sein. Zwei Gewichtsteile Sucrose pro Gewichtsteil Protein ergeben einen sehr guten Stabilisierungseffekt. Bei weniger wirksamen Stabilisatoren sind zwecks Erzielung optimaler Stabilisierungswirkung gelegentlich größere Mengen erforderlich. Praktisch brauchbare obere Grenzen für die zu verwendende Menge an Stabilisator sind durch die Forderung nach Isotonie und die Wirksamkeit in bestimmten Sacchariden als Stabilisator gegeben und dies wird durch die folgende Tabelle erläutert. Die Zahlenwerte sind in mg Zucker pro mg Lösung

209821/0960

angabe. Die Zuckergewichte sind ihrerseits auf die durchschnittliche Menge von 1 mg Protein pro ml bezogen.

Tabelle I

	Isotonie bei mg/ml	Zunahme der Isotonie wegen mg Stabilisator/mg Protein			
		2,0	4,92	5,05	9,25
NaCl	9,0	---	---	---	---
Fructose	50,5	3,96 %	---	10 %	---
Galactose	49,2	4,07 %	10 %	---	---
Sucrose	92,5	2,16 %	---	---	10 %

Zwei Gewichtsteile Zucker pro Gewichtsteil Protein-Metall-Chelat erhöhen den osmotischen Druck um 3,96 % für Fructose, um 4,07 % für Galactose und um 2,16 % für Sucrose.

In pharmakologischer Hinsicht kann der zulässige Werte um 10 % überschritten werden, wenn intramuskular injiziert wird, insbesondere wenn leicht verdünnbare und leicht absorbierbare Stoffe, wie Natriumchlorid und Zucker, intramuskular injiziert werden. Sieht man eine 10 %-ige Hypertonie als zulässig an, dann beträgt der obere Grenzwert für Fructose 5,05 Teile, für Galactose 4,92 Teile und für Sucrose 9,25 Teile pro Teil Protein.

In Bezug auf die durch den Stabilisator erzeugte Hypertonie ist von den drei der oben erwähnten Stabilisatoren der Sucrose der Vorzug zu geben, da sie bei einem bestimmten Gewichtsverhältnis von Zucker zu Protein die kleinste Hypertonie ergibt.

Größere Mengen an Zucker enthaltenen Lösungen können ohne weiteres dadurch hergestellt werden, daß Kochsalz mit einer Konzentration von weniger als 0,9 % eingesetzt wird. Dies ist jedoch in der Praxis schwierig durchzuführen, da es damit erforderlich wird sterile isotone physiologische Kochsalzlösungen mit sterilem Wasser im geeigneten Mengenverhältnis zu verdünnen und dieses Verhältnis vorher zu berechnen.

Wenn zwecks Erzielung ausreichender Stabilität oder aus anderen Gründen noch größere Mengen an Saccharid wünschenswert sind, dann kann die physiologische Kochsalzlösung überhaupt durch unter Verwendung eines Zuckers oder Gemischen von Zuckern hergestellte isotone Lösung ersetzt werden. In diesem Falle beträgt die maximal zulässige Menge an Fructose 50,5 mg/ml, für Galactose 49,2 mg/ml und für Sucrose 92,5 mg/ml.

In erfindungsgemäß herstellbaren Mischungen liegt das Protein in Form des Metall-Chelates vor, welches im wesentlichen frei ist von anderen Proteinen, die in den verwendeten Ausgangsstoffen mit dem erwünschten Protein vergesellschaftet sind. Diese Metallchelate stellen weiße Pulver dar, welche in Wasser, physiologischer Kochsalzlösung und Pufferlösungen löslich sind; die so erhaltenen Lösungen können injiziert werden, ohne daß antigenetische Reaktionen auftreten, wie sie bei Injektion von körperfremden Proteinen die Regel sind. Die Ergebnisse einer Elementaranalyse, das Infrarotspektrum, das Ultraviolettpektrum, die optische Drehung und sonstige analytische Daten stimmen überein mit der Annahme, daß es sich um ein Protein-Metall-Chelat handelt. Diese Protein-Metall-Chelate mildern in Mäusen die Folgen von Überanregung, wirken antiinflammatorisch und gegen Viren, wie durch pharmakologische und klinische Untersuchungen

209821/0960

erhärtet werden könnte.

Pharmakologisch und klinisch zeigt sich, daß erfindungsgemäß herstellbare Mischungen zur Behandlung verschiedenster Krankheiten von Säugetieren verwendet werden können. Bei Verwendung dieser Mischungen können die Krankheitssymptome teilweise oder vollständig beseitigt werden. Die Anwendbarkeit dieser Mischungen ist keinesfalls auf irgendeine Art von Säugetieren beschränkt.

Bei intramuskulärer Verabreichung von 0,2 mg der erfindungsgemäß herstellbaren Mischungen können bei verschiedensten Säugetieren akute Entzündungen, insbesondere der Harnwege und Gelenke, unterdrückt werden. Solche Mischungen besitzen auch ein breites Wirkungsspektrum gegen Viren. Überraschenderweise wirken solche Mischungen bereits in Dosen von 0,004 mg/kg bei chronischen Erkrankungen über mehrere Wochen nachdem das Allgemeinbefinden des Patienten zunächst normalisiert wurde. Erfindungsgemäß herstellbare Mischungen können auch bei Behandlung von Allergien, beispielsweise von Reaktionen nach Verabreichung von Penicillin, von multiple wheals, von Verhärtungen, Erythemen, Endemen und Juckreiz, verwendet werden. Erfindungsgemäß herstellbare Mischungen erweisen sich bei der Behandlung von chronischen und hartnäckigen Bakterieninfektionen, beispielsweise bei der Behandlung von Infektionen der Genitalien, der Harnwege und der Atmungsorgane durch Staphylococcen, Streptococcen, Enterococcen und Colibazillen, als besonders wirksam.

Erfindungsgemäß herstellbare Mischungen, welche durch an sich bekanntes Gefrierverfahren eine Lösung des Proteins bzw. des Protein-Metall-Chelats und in es stabilisierend wirkenden

Saccharide hergestellt worden sind, können zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Hierbei können Lösungen des Proteins und des Saccharids allein oder auch Bakteriostatika, Bakterizide, spezifisch wirkende Steroide, wie progestationale, östrogene, androgene und antiinflammatorische Steroide, Verdickungsmittel, Konservierungsmittel und pharmazeutisch verträgliche Farbstoffe zusätzlich enthaltende Lösungen verwendet werden. In solchen Lösungen können auch Salze, beispielsweise Natriumchlorid, in einer Menge vorliegen, die die erhaltene Lösung isoton macht.

Das Protein-Saccharid-Gemisch kann auch zu sterilen Lösungen, Suspensionen usw. verarbeitet werden, die ohne weitere Manipulationen direkt injiziert werden können.

Die erfindungsgemäß herstellbaren trockenen Gemische sind im Gegensatz zum reinen Protein, welches bei Raumtemperatur bereits innerhalb einiger Tage stark zerstört wird, über viel Wochen bei Raumtemperatur ohne irgendwelchen nachweisbaren Abbau stabil. Auch die Stabilität wässriger Lösungen erfindungsgemäß herstellbarer Mischungen bei Raumtemperatur beträgt mehrere Tage oder Wochen, wogegen Lösungen des Proteins allein innerhalb weniger Stunden unbrauchbar werden. Beispielsweise ist eine Lösung des Proteins und Sucrose bei Raumtemperatur und bei 37°C mehr als einen Monat ohne meßbare Veränderung lagerfähig. Selbst Dulcitol und Maltose, welche das Protein während des Gefriertrocknens in geringerem Maß gegen Abbau schützen als Sucrose, machen Lösungen des Proteins zumindest für eine Woche bei Raumtemperatur stabil; in erfindungsgemäß herstellbaren Abbau beginnt hierbei erst nach einer Woche.

im  
Das/Gemisch mit Suor s der ein = anderen Saccharid  
der angegebenen Art vorliegende Protein ist bei Raumtemperatur  
soweit stabil, daß das Protein auch topisch und oral verab-  
reicht werden kann. Diese Verabreichungswege sind sonst für  
bei Raumtemperatur nicht lagerfähige Pharmazeutika nicht gangbar.  
Das in erfindungsgemäßer Weise stabilisierte Protein ist gegen-  
über einem Abbau durch proteolytische Enzyme bemerkenswert  
resistent, wodurch die orale Verabreichung desselben ermöglicht  
wird.

Es ist somit möglich aus einem in erfindungsgemäßer Weise  
hergestellten Gemisch von Protein und Saccharid für orale oder  
topische Verabreichung geeignete Präparate in üblicher Weise  
unter Zuhilfenahme von Trägern und/oder Exzipientia herzustellen.  
Beispiele für topisch anwendbare Präparate sind Salben, Lotionen,  
Cremes, Sprays, Puder, Tropfen (beispielsweise für Ohren und  
Augen), Suppositorien (beispielsweise für die Behandlung von  
rectalen Entzündungen) und Aerosole. Salben und Cremes können  
auf Grundlage von Wasser oder Ölen hergestellt werden, wobei  
geeignete Verdickungsmittel und/oder Gelmittel verwendet  
werden können. Brauchbare Salbengrundlagen können Wasser und/oder  
in Öl, beispielsweise Paraffinöl oder ein pflanzliches Öl ent-  
halten. Je nach Salbengrundlage können als Verdickungsmittel  
Weichparaffin, Aluminiumstearat, Ketostearylalkohol, Poly-  
äthylenglykole, Wollfett, hydriertes Wollfett, Bienenwachs  
u.dgl. verwendet werden.

Lotionen können auf Grundlag v n Wasser der Ölen h rge-  
st ilt w rden und enthält n in d r Reg l zumind st ein  
Stabilisierungsmittel, Emulgiermittel, Dispergi rmittel,

Suspensionshilfsmittel, Verdichtungsmittel und/oder Farbstoffe, Duftstoffe u.dgl.

Puder können unter Verwendung geeigneter Pudergrundlagen, beispielsweise Talkum, Lactose, Stärke u.dgl. hergestellt werden. Tropfen können unter Verwendung einer wässrigen oder nicht-wässrigen Grundlage hergestellt werden, die ebenfalls zumindest ein Dispergiermittel, Suspensionshilfsmittel, und/oder Lösungsvermittler u.dgl.. enthält.

Solche pharmazeutische Präparate können auch ein oder mehrere Konservierungsmittel oder Bakterioostatika, beispielsweise Methylhydroxybenzoat, Propylhydroxybenzoat, Chlorkresol, Benzalkoniumchloride u.dgl. enthalten. Zusätzlich können weitere Wirkstoffe, beispielsweise antimikrobiell wirkende Stoffe, insbesondere Antibiotika und/oder antiinflammatorisch wirkende Steroide, eingearbeitet werden.

Die Menge des in erfindungsgemäß herstellbaren Mischungen enthaltenen Proteins hängt von der Art der herzustellenden Präparate ab, beträgt jedoch in der Regel 0,001 bis 5 Gew.-%. Vorteilhafter ist es jedoch solche Mischungen mit einem Gehalt von 0,001 bis 0,5 %, insbesondere 0,01 bis 0,25 %, an Protein herzustellen.

Beispiele für solche oral verabreichbare Präparate sind übliche flüssige Präparate, beispielsweise Lösungen und Suspensionen, und feste Präparate, beispielsweise Tabletten, Pillen, Kapseln und umhüllte Mikrokugeln. Vorzugsweise werden beispielsweise Tabletten hergestellt, welche erst im Verdauungstrakt, insbesondere erst im Dünndarm, zerfallen. Bei der Herstellung solcher Tabletten können übliche Stoffe, für die Be-



s hichtung (erst löslich im Verdauungstrakt) und Füllstoffe, beispielsweise Weizenstärke, Lactose, Talkum, Pflanzengummi u.dgl., verwendet werden.

Im folgenden wird zunächst die Herstellung des Protein-Metall-Chelats beschrieben. Im Rahmen dieser Herstellung wird, soferne keine anderen Temperaturangaben gemacht sind, in einem kalten Raum (2 bis 5°C) gearbeitet.

Frische Rinderleber wurde nach dem Mahlen in einen Kunststoffbehälter eingebracht und dort unter Rühren mit 2 l kaltem destilliertem Wasser pro kg Leber versetzt. Der pH-Wert der Mischung wurde anschließend mit 0,1n NaOH auf 7,5 bis 7,6 eingestellt, worauf so viel 2n  $\text{MnSO}_4$ -Lösung zugesetzt wurde, daß die Molarität der Gemisches 0,05 betrug. Sodann wurde der pH-Wert des Gemisches erneut auf 7,6 eingestellt und der Lösung soviel kaltes Frischwasser zugesetzt, daß pro kg Leber 3l Wasser vorlagen. Schließlich wurden pro kg Leber 50 ml Toluol zugegeben, worauf das Gemisch in einem kalten Raum über Nacht gerührt wurde.

Am folgenden Morgen wurde die erhaltene Suspension durch ein Kunststoffsieb gegossen, worauf das Filtrat unter gelindem Rühren mit einem dem Volumen des Filtrats gleichem Volumen an kaltem Aceton (-10°C) versetzt wurde, wobei das Aceton der Mischung über ein sich bis unter die Oberfläche der Mischung erstreckendes Glasrohr zugeführt wurde. Der sich hierbei bildende Niederschlag wurde sofort abzentrifugiert und unmittel-

bar anschließend mit etwa 25 Vol.-% 0,05 M Maleat-Mn<sup>++</sup>-Puffer versetzt, wobei die verwendete Menge an Puffer, bezogen auf das Volumen des Filtrats vor der Zugabe des Acetons, berechnet wurde. Die Mischung wurde nun in einem kalten Raum mehrere Stunden gerührt, dann über ein Kunststoffsieb filtriert und durch Zentrifugieren geklärt.

Die erhaltene klare Flüssigkeit wurde unter Rühren in einem Kessel aus rostfreiem Stahl auf 60°C erhitzt und, gerechnet vom Beginn des Erhitzens, 20 Minuten auf 60°C gehalten. Anschließend wurde die Mischung so rasch als möglich auf 5°C gekühlt, worauf der entstandene voluminöse Niederschlag entweder abzentrifugiert oder durch langsames Filtrieren über eine große Filterfläche abfiltriert wurde, worauf die so erhaltene klare Lösung auf eine Temperatur von 2 bis 5°C gebracht und mit 0,9 Vol.-% denaturierten Äthanol (auf -10°C gekühlt) rasch versetzt wurde, das aus einem Trichter über ein sich bis unter die Oberfläche des Gemisches erstreckendes Glasrohr zugeführt wurde.

Nachdem die gesamte Menge des Alkohols zugesetzt worden war, wurde die Mischung in einem kalten Raum stehen gelassen bis sich der entstandene Niederschlag eben zusammengeballt und abgesetzt hatte, worauf der Niederschlag abzentrifugiert oder unter geringem Unterdruck abfiltriert und im unmittelbaren Anschluß daran in kaltem 0,001 M Maleat-Mn<sup>++</sup>-Puffer von pH 7,0 aufgelöst wurde. Der Puffer wurde hierbei in einer Menge von 4 Vol.-% pro Gew.-% Niederschlag verwendet. Die erhaltene Lösung wurde durch Zentrifugieren geklärt, worauf nach dem Abtrennen der klaren Flüssigkeit der Niederschlag erneut mit

geringen Mengen an kalter Pufferlösung extrahiert wurde und die erhaltenen Lösungen erneut zentrifugiert wurden. Die erhaltenen klaren Lösungen wurden miteinander vereinigt und unmittelbar gefriergetrocknet, da es nicht erforderlich war vor dem Gefrieretrocknen die Puffersubstanz durch Dialyse zu entfernen. Die so erhaltene pulverige Substanz ist bei Raumtemperatur über mehrere Monate stabil, wird aber dennoch vorzugsweise in einem kalten Raum verwahrt. Die erhaltene Substanz stellt ein Gemisch des erwünschten Proteins, von Arginase und anderen Enzymen und Albumin und anderen bedeutungslosen Proteinen dar.

Die so erhaltene Substanz wurde in etwa der zwölffachen Volummenge kaltem 0,2 M Tris-0,001 M-Mg<sup>++</sup>-Puffer von pH 7,8 gelöst, worauf die Lösung mit einer kalten gesättigten Ammonsulfatlösung, welche an Mg<sup>++</sup> 0,001 molar war, behandelt wurde. Die Ammonsulfatlösung wurde mit Anteilen zu je 375 ml pro 1000 ml Pufferlösung verwendet, so daß die Konzentration der erhaltenen Lösung an Ammonsulfat 15, 30, 45, 60 bzw. 75 % betrug. Die Ammonsulfatlösung wurde stets unter Rühren und tropfenweise bei 0 bis 5°C zugesetzt, wobei nach jeder Zugabe von Ammonsulfat 30 Minuten gerührt und der entstandene Niederschlag durch Zentrifugieren mit 4500 U/min während 30 Minuten bei 0°C abgetrennt wurde.

Der zuerst erhaltene Niederschlag A, welcher hochmolekulare unerwünschte Proteine enthielt, wurde verworfen. Die im Zuge der zweiten und dritten Fällung erhaltenen Niederschläge B und C wurden miteinander vereinigt; diese Niederschläge enthalten Arginase und andere Enzyme und können zur Isolierung dieser Enzyme aufgearbeitet werden. Die im Zuge der vierten und fünften

Fällung erhaltenen Niederschläg D und E wurden ebenfalls miteinander vereinigt; diese Niederschläge enthalten das gewünschte Protein und als Verunreinigungen Albumin und verschiedenen anderen Proteine höheren oder auch niedrigeren Molekulargewichts. Die nach der letzten Fällung als Rückstand anfallende klare Flüssigkeit enthält niedrigmolekulare Proteine und sonstige Verunreinigungen und wurde verworfen.

Die Niederschläge D und E wurden mit möglichst genau/einer Konzentration von 10g/100 ml in 0,03 M-Tris-0,001 M-Mg<sup>++</sup>-Puffer von pH 7,8 gelöst, worauf die Lösung gegen kalte Pufferlösung dialysiert wurde bis die Reaktion auf Sulfation negativ war. Die dialysierte Lösung wurde durch Zentrifugieren geklärt und die erhaltene klare Lösung wurde über ein feinporiges Filter (Millipore-Filter) filtriert, worauf das erhaltene Filtrat direkt auf den Kopf einer mit Sephadex G-100 (mit Epichlorhydrin quervernetztes Dextran-Harz, Pharmacia, Schweden) gefüllten Chromatographiersäule (76 mm x 458 mm) aufgegeben wurde. Das verwendete Dextranharz wurde nach den Angaben des Herstellers angequollen und gewaschen. Die gefüllte Kolonne wurde mit 0,03 M-Tris-0,001 M-Mg<sup>++</sup>-Puffer von pH 7,8 ins Gleichgewicht gebracht, und die Durchflußgeschwindigkeit durch die Kolonne wurde auf etwa 20 ml/h eingestellt.

Nachdem die Probe auf die Kolonne aufgebracht worden war, wurde sie innerhalb der ersten drei Zentimeter der Kunstharzfüllung der Kolonne während 30 bis 45 Minuten ins Gleichgewicht gebracht, worauf mit dem Fraktionieren begonnen wurde. Beim Fraktionieren wurden einzelne Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend photometrisch mit Licht der Wellenlänge 280 nm untersucht.

209821/0960

Noch bevor das gewünschte Protein enthaltende Fraktionen aufgefangen wurde, wurden zwei Absorptionsmaxima zeigende Fraktionen erhalten, die Albumin und sonstige unerwünschte Proteine mit dem Molekulargewicht des Albumins vergleichbarem oder höherem Molekulargewicht enthielten. Solche Absorptionsmaxima zeigende Fraktionen wurden verworfen. Das erwünschte Protein ist in der Regel in den Fraktionen 13 bis 17 des Eluates enthalten, und diese Fraktionen wurden zwecks Weiterverarbeitung miteinander vereinigt. Beim weiteren Eluieren der Kolonne, insbesondere beim Eluieren mit Puffer höherer Konzentration, wurden niedrigmolekulare Proteine enthaltende Fraktionen aufgefangen. Diese niedrigmolekularen Proteine wurden aus der Kolonne entfernt um diese zwecks Aufarbeitung einer weiteren Charge zu reinigen.

Die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen wurden gegen 0,001 mg  $Mg^{++}$ -Lösung, welche unter Verwendung von entionisiertem Wasser hergestellt worden war, dialysiert bis sie an Tris-Puffer weniger als  $10^{-6}$  molar sind. Anschließend wurde gegen an o-Phenanthrolin oder Äthylendiamintetraessigsäuresalzen  $1 \times 10^{-3}$  bis  $5 \times 10^{-3}$  molaren entionisierten Wassers dialysiert bis die Konzentration des Dialysats an  $Mg^{++}$  geringer war als  $10^{-7}$  m. Falls ein Protein-Metall-Chelat hergestellt werden sollte, dessen vorwiegend vorhandenes Metall ein anderes, beispielsweise Zn, Ca, Cu oder Fe, war als Magnesium, wurde mehrere Tage bei  $4^{\circ}C$  weiter dialysiert und sodann das Protein etwa ein Tag mit einer Lösung eines löslichen Salzes (deren Molarität eine solche war, daß das Protein in Lösung verblieb) in Berührung gebracht, worauf überschüssiges Metallion

209821/0960

in der angegebenen Weise entfernt wurde. Die erhaltene Lösung wurde durch Zentrifugieren geklärt.

Auf diese Weise konnten aus 75 kg frischer Rinderleber (22,5 kg Trockengewicht) etwa 200 g (1 %) eines das Protein-Mn<sup>++</sup>-Chelat enthaltenden Zwischenproduktes erhalten werden, wobei aus dem Protein-Mn<sup>++</sup>-Chelat erhaltenen Fraktionen D und E 12,5 bis 17,5 g (0,06 bis 0,08 %) <sup>das</sup> erwünschte Protein in Form des Mg-Chelats enthaltenden Produkte erhalten wurden. Beim Chromatographieren dieser Fraktionen D und E auf einer mit Sephadex-G 100 gefüllten Kolonne wurden 2,4 bis 2,9 g des erwünschten Proteins (Mg-Chelat) erhalten, was, bezogen auf das Trockengewicht der eingesetzten Leber einer Ausbeute von 0,011 bis 0,014 % entspricht.

A. Stabilisieren während des Gefriertrocknens.

15 Gew.-teile des in der obigen Weise isolierten Proteins und 30 Gew.-teile eines Zuckers der bereits angegebenen Art wurden miteinander vermischt, worauf die Mischung in 30 Gew.-Tln. entmineralisiertem Wasser gelöst wurde, dessen pH-Wert mittels gasförmigen Ammoniaks auf 9,4 gebracht worden war. Die erhaltene Lösung wurde sodann mit geringem Saugdruck über ein angefeuchtetes feinporiges Filter filtriert, dessen Poren eine Größe von 0,45 µm besaßen. Das Volumen des Filtrats wurde bestimmt und die Gewichtsmenge des im Filtrat enthaltenen Proteins wurde wie folgt errechnet:

2 ml des Filtrats wurden mit 3 ml Biuret-Reagens vermischt, worauf die Mischung 15 Minuten auf 37°C gehalten wurde und anschließend die Absorption des Gemisches bei 555 µm gegen Wasser in einer Pufferlösung als Vergleichslösung bestimmt wurde. Di

Konzentration in mg/ml wurde durch Multiplikation des für die Absorption 555  $\mu$ m erhaltenen Wertes mit dem Faktor 9,1 erhalten. Dieser Umrechnungsfaktor wurde graphisch ermittelt usw. aus einer Kurve, welche sich aus den unten angegebenen Werten ergab, w~~o~~ die Proteinkonzentration bekannt war.

Protein mg/ml*	Absorption $A_{555}$
3,7	0,407
1,8	0,197
0,9	0,100
0,45	0,050
0,22	0,024
0	0

\* Trockengewicht (ca 10 % weniger als im feuchten Zustand)

Die Probe wurde sodann eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Material wurde sodann in entmineralisiertem Wasser, dessen pH-Wert mit Ammoniak auf 9,4 gebracht worden war, aufgenommen, wobei eine Lösung etwa der ursprünglichen Konzentration hergestellt wurde. Die erhaltene Lösung wurde auf eine allenfalls vorhandene Trübung geprüft und dann über ein angefeuchtetes feinporiges Filter mit einer Porengröße von 0,45  $\mu$ m filtriert. Anschließend wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt und der Wert  $A_{280}/mg$  ermittelt. Der Proteinverlust wurde aus der Differenz zwischen der aus dem Protein gewicht und dem Volumen der Lösung vor dem Gefrieretrocknen errechneten Proteinkonzentration und der aus

dem Proteingehalt und dem Volumen der Lösung nach dem Gefrier-  
trocknen errechneten Proteininkonzentration ermittelt. Der pro-  
zentuelle Verlust wurde auf die vor dem Gefrieren vorhandene  
Menge an Protein bezogen. Auch bei späteren Chargen  
wurde in der gleichen Weise vorgegangen.

In den Tabellen II und III ist nun die Wirksamkeit ver-  
schiedener Polyhydroxyverbindungen als Stabilisatoren in der  
oben angegebenen Weise errechnet worden. Hierbei ist der Protein-  
verlust nach einmaligem und auch nach viermaligem Gefriertrocknen  
angegeben. Die in der Tabelle II angegebenen Saccharide erweisen  
sich als ausgezeichnete Stabilisatoren, welche den Proteinverlust  
auch nach viermaligem Gefriertrocknen auf etwa 15 % oder weniger  
beschränken, wogegen nicht-stabilisiertes Protein einen Protein-  
verlust von 61 bis 80 % ergibt. Die aus so stabilisiertem Protein  
erhaltenen Lösungen sind kristallklar, wobei lediglich  $\alpha$ -Methyl-  
-D-Glucosid eine Ausnahme bildet. Die in der Tabelle III ange-  
gebenen Saccharide erhöhen die Stabilität des Proteins in gerin-  
gerem Maße, wobei aus dem Protein-Saccharid-Gemisch hergestellte  
Lösungen in Wasser oder aus diesem Gemisch hergestellte isoton  
Lösungen in der Regel trüb sind. Aus diesem Grunde sind die in  
der Tabelle III angegebenen Saccharide vom wirtschaftlichen  
Standpunkt trotz des Umstandes weniger interessant, daß sie einen  
Proteinverlust im wesentlichen in geringen Grenzen halten.



Tabelle II

## Wirkung des Gefriertrocknens

Stabilisator	Aussehen des gefrierge- trockneten Produktes	Konzen- tration der Aus- gangslö- sung des Proteins in mg/ml	A <sub>280</sub> zu Be- ginn	(+)ΔA <sub>280</sub> /mg gefriergetrock- net		Aussehen der hergestellten Lösung gefriergetrock- net		Proteinverlust in % gefriergetrocknet	
				1mal	4mal	1mal	4mal	1mal	4mal
I Monosaccharide									
a) α-D-Galactose	körnig	0,48	0,642	0,033	0,064	klar	klar	2,1	2,1
b) Fructose		0,46	0,641	0,034	0,071	"	"	3,3	5,4
c) D(-)Arabinose		0,55	0,525	0	0,066	"	"	0	3,6
d) L(+)-Arabinose		0,55	0,527	0	0,011	"	"	0	0
e) D-Fructose		0,53	0,528	0,004	0,051	"	"	0	0
f) D-Glucose		0,51	0,606	0,053	0,211	"	"	5,9	15,7
g) D(+)-Mannose		0,48	0,568	0,028	0,222	"	"	2,0	14,0
II Disaccharide									
a) Sucrose	"	0,49	0,604	0	0,058	"	"	0	6,1
III Alkyl-Glycoside									
a) α-Methyl-D- -glucosid	"	0,54	0,681	0	0,072	"	äußerst geringe Trübung	0	1,8
b) β-Methyl-D- -galactosid	flaumig	0,42	0,681	0,014	0,054	"	klar	0	2,6
IV Vergleich									
a) kein Stabilisator	"	0,48	0,662	---	---	trüb mit	trüb mit	12,5	79,2
b) kein Stabilisator	"	0,46	0,663	---	---	unlös- lichen Flocken	unlös- lichen Flocken	10,9	60,8

Tabelle III

## Wirkung des Gefrieretrocknens

Stabilisator	Ausschen des gefriergetrockneten Produktes	Konzentration der Auslösung des Proteins in mg/ml	A <sub>280</sub> zu Beginn	(+) ΔA <sub>280</sub> /mg gefriergetrocknet		Ausschen der hergestellten Lösung gefriergetrocknet		Proteinverlust in % gefriergetrocknet	
				1mal	4mal	1mal	4mal	1mal	4mal
V Disaccharide									
a) Maltose	flaumig	0,44	0,638	0,132	0,186	geringe Trübung	geringe Trübung	13,6	15,9
b) Lactose	"	0,40	0,645	0,119	0,244	"	"	12,5	22,5
VI Zuckeralkohole									
a) Sorbit	"	0,47	0,628	0,053	0,154	äußerst geringe Trübung	geringe Trübung	8,5	17,0
b) Mannit	"	0,48	0,604	0,051	0,115	"	"	6,2	10,4
c) Inosit	"	0,46	0,633	0,126	0,217	geringe Trübung	geringe Trübung	10,9	30,4
d) Dulcitol	"	0,48	0,619	0	--	klar	äußerst geringe Trübung	0	39,6
VII Zuckersäuren									
a) D-Glucuronsäure	körnig	0,49	0,610	0,194	0,020	wolkig	klar <sup>1</sup>	53,1	77,6
b) D-Galacturonsäure	"	0,44	0,658	0,138	0,007	schwach wolkig	klar <sup>1</sup>	40,9	63,7
<sup>1</sup> im Hinblick auf die geringe Menge des nach Gefrieretrocknen verbliebenen Proteins									

209821/0960

BAD ORIGINAL

**B. Lagerbeständigkeit im festen Zustand.**

25 mg frisch hergestelltes Protein-Metall-Chelat und 50 mg Sucrose, Fructose oder Galactose wurden in 50 ml entmineralisiertem Wasser gelöst, dessen pH-Wert mit Ammoniakwasser auf etwa 9 eingestellt worden war, worauf die erhaltenen Lösungen filtriert und gefriergetrocknet wurden. Die gefriergetrockneten Produkte wurden ebenso wie eine Probe des als Ausgangsstoff verwendeten Protein-Metall-Chelats bei Raumtemperatur unter Luftzutritt verwahrt. Die Lagerfähigkeit der Mischungen bei Raumtemperatur ist in Tabelle IV angegeben, in welcher verschiedenen Lagerungszeiträumen verschiedene Absorptionswerte  $A_{280}$  von Lösungen zugeordnet sind, die an Lösungen von einer bestimmte Zeit gelagerten festen Proben ermittelt wurden.

**Tabelle IV**  
**Stabilität fester Mischungen bei Raumtemperatur**

<u>Stabilisatoren</u>	$A_{280}/\text{mg}$	$A_{555}(\text{korr.})$
<u>1. Sucrose</u>		
zu Beginn	0,637	0,052
1 Woche	0,595*	0,041
1 Monat	0,633	0,041
2 Monate	0,637	0,040
4 Monate	0,602	0,047
<u>2. Fructose</u>		
zu Beginn	0,631	0,050
1 Woche	0,589*	0,048
1 Monat	0,768	0,037
2 Monat	0,666	0,046
4. M nat	0,758	0,055

## Forts tzung der Tabelle IV

Stabilisatoren	$A_{280}/mg$	$A_{555}(\text{korr.})$
<b>3. Galactose</b>		
zu Beginn	0,630	0,051
1 Woche	0,615	0,044
1 Monat	0,649	0,041
2 Monate	0,689	0,042
4 Monate	0,673	0,055

\* Zeitweilig wurden nach etwa ein- bis zweiwöchiger Lagerung geringfügig niedrigere Werte beobachtet. Alle Proben lösten sich nach der Lagerung zu klaren Lösungen, die keinen Niederschlag enthielten.

Die angegebenen Zahlenwerte legen dar, daß auch nach viermonatiger Lagerung eines gefriergetrockneten Gemisches aus Prot in und Saccharid kein nennenswerter Abbau des Proteins eintritt. Unter den gleichen Bedingungen tritt bei Lagerung des reinen Proteins innerhalb eines Monats ein 50 %iger Verlust auf.

Zwecks Bestimmung der Stabilität des Protein-Metall-Chelats bei 37°C wurden 50 mg dieses Chelats in 100 ml einer wässrigen Lösung gelöst, die 1 mg Sucrose/ml enthielt. Der pH-Wert des verwendeten Wassers wurde mit Ammoniakwasser auf 9,4 eingestellt. Die erhaltene Lösung wurde über ein feinporiges Filter von 0,45  $\mu m$  Porenweite filtriert. Aus einer Probe der erhaltenen Lösung wurde  $A_{280}$  und die Proteinkonzentration bestimmt. Der Rest der erhaltenen Lösung wurde innerhalb eines Zeitraumes von vier Tagen gefriergetrocknet, worauf das gefriergetrocknete Produkt bei 37°C gelagert wurde. In der folgenden Tabelle V sind nach verschiedenen Lagerungszeiten erhaltene Analysenwerte angegeben.

Tabelle V

Lagerbeständigkeit bei 37°C

Stabilisatoren	$A_{280}/mg$	$A_{555}$ (korr.)	Anssehen der hergestellten Lösung
----------------	--------------	-------------------	-----------------------------------------

## Suorose

zu Beginn	0,5194	0,038	klar
1 Woche	0,4846	0,041	"
2 Wochen	0,5216	0,039	"
1 Monat	0,5081	0,039	"
2 Monate	0,5324	0,039	"

Aus den in der Tabelle angegebenen Werten ergibt sich, daß das Protein auch bei zweimonatiger Lagerung bei 37°C keinen nennenswerten Abbau erleidet. Das reine Protein erleidet bei Lagerung unter den gleichen Bedingungen einen 50 %igen

Abbau innerhalb von 11 Tagen.

C. Lagerfähigkeit von Lösungen

25 mg Protein-Metall-Chelat und 50 mg Suorose, Maltose

oder Dulcitol wurden in der oben angegebenen Weise in 50 ml entmineralisiertem Wasser gelöst, worauf die Lösungen bei Raumtemperatur verschieden lange gelagert und nach Ablauf der Lagerzeit der Proteinverlust bestimmt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle VI zusammengefaßt.

**Tab 11 VI**  
**Stabilität von Lösungen bei Raumtemperatur**

Stabilisatoren	$A_{280}/mg$	$A_{555}$ (korr.)	Aussehen der Lösung
<b>1. Sucrose</b>			
zu Beginn	0,562	0,055	klar
1 Woche	0,640	0,052	"
3 Wochen	0,626	0,045	"
5 Wochen	0,702	0,051	sehr schwach getrübt
<b>2. Dulcitol</b>			
zu Beginn	0,618	0,052	klar
1 Woche	0,637	0,054	"
3 Wochen	0,696	0,049	"
5 Wochen	0,660	0,055	"
<b>3. Maltose</b>			
zu Beginn	0,603	0,065	klar
1 Woche	0,725	0,061	"
3 Wochen	0,759	0,063	"

\* wahrscheinlich wegen bakterieller Verunreinigung

Die in der Tabelle angegebenen Werte zeigen, daß bei Lagerung wässriger Lösungen von Protein und Sucrose einerseits bzw. Protein und Dulcitol andererseits bei Raumtemperatur das Protein innerhalb drei Wochen oder mehr kaum abgebaut wird. Lösungen von Mischungen aus Protein und Maltose lassen einen gewissen Abbau des Proteins erkennen. Eine Lösung des Proteins allein gibt einen mehr als 70 %igen Verlust innerhalb 36 Stunden.

Patentansprüche :

- 52 -

## P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Isoliertes wasserlösliches nicht-antigenetisches Protein vom Globulintyp gemäß Stammpatent Nr. ... (Anmeldung B 89232 IVa/30h) im stabilisierten Zustand, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Protein als Gemisch mit einer stabilisierend wirkenden Menge eines Saccharids, u.zw. (a) von Sucrose, (b) einer Pentose, Hexose oder Heptose mit einer Hydroxygruppe an einer freien Carbonylgruppe einer Keto- oder Aldehydgruppe benachbarten Kohlenstoffatom, wobei die räumliche Stellung der Hydroxygruppe entgegengesetzt ist zu jener von zwei an den beiden benachbarten Kohlenstoffatomen befindlichen Hydroxygruppen, (c) eines Nieder-Alkyl-Acetals einer Pentose, Hexose oder Heptose, (d) von Glucose, und (e) von Mannose, vorliegt.

2. Stabilisiertes Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewichtsverhältnis von Saccharid zu Protein zumindest 2 : 1 beträgt.

3. Stabilisiertes Protein nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es einen trockenen Feststoff darstellt, welcher im wesentlichen frei ist von denaturiertem Protein.

4. Stabilisiertes Protein nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es in Form eines, beispielsweise in einer Phiole oder in einer Ampulle, steril eingeschlossenen biologischen Präparates vorliegt, welches im wesentlichen frei ist von denaturiertem Protein und für Injektionszwecke geeignet ist.

-53-

5. Stabilisiertes Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es im Präparat in Form eines trockenen Festkörpers vorliegt.

6. Verfahren zur Herstellung eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch des Proteins mit einer stabilisierend wirkenden Menge eines Saccharids, u.zw. (a) von Sucrose, (b) einer Pentose, Hexose oder Heptose mit einer Hydroxygruppe an einer freien Carbonylgruppe einer Keto- oder Aldehydgruppe benachbarten Kohlenstoffatomen, wobei die räumliche Stellung der Hydroxygruppe entgegengesetzt ist zu jener von zwei an den beiden benachbarten Kohlenstoffatomen befindlichen Hydroxygruppen, (c) eines Nieder-Alkyl-Acetals einer Pentose, Hexose oder Heptose, (d) von Glucose und von (e) Mannose, hergestellt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässrige Lösung des Gemisches gefriergetrocknet wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine im wesentlichen von denaturiertem Protein freie wässrige Lösung gefriergetrocknet wird.

- 53 -

29.7.68/ /n

209821/0960

BAD ORIGINAL